




**HPLC METHOD FOR PURIFYING ORGANIC COMPOUNDS**

**Patent number:** HU0003272  
**Publication date:** 2001-03-28  
**Inventor:** ABEDI JALEH AZMI (US)  
**Applicant:** AVENTIS CROPS SCIENCE SA (FR)  
**Classification:**  
- international: G01N31/00  
- european: B01D15/08; G01N30/82; G01N30/90  
**Application number:** HU20000003272 20000810  
**Priority number(s):** US19990148153P 19990810

**Also published as:**

 EP1162456 (A1)  
 JP2001124755 (A)  
 CA2315542 (A1)

**Report a data error here**

Abstract not available for HU0003272  
Abstract of corresponding document: **EP1162456**

An HPLC method which purifies and/or characterizes large numbers of related compounds, for example, those prepared for use in combinatorial libraries, is disclosed. The compounds are purified on a semi-preparative or preparative scale, enabling rapid preparation of combinatorial libraries with minimal operator involvement, and, preferably, with a purity greater than about 90%.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

Lapsed

Application number: P0003272

Application date: 2000.08.10

Date of communication: 2000.10.30

Publication date: 2001.03.28

Convention priority: US60148153 - 1999.08.10

IPC: G01N-031/00

Hungarian title: Nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiai módszer szerves vegyületek felbontására

English title: HPLC METHOD FOR PURIFYING ORGANIC COMPOUNDS

Applicant: Aventis CropScience S.A., Lyon (FR)

Inventor: Abedi, Jaleh Azmi, Raleigh, North Carolina (US)

Representative: dr. Fehérvári Flóra, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest (HU)

**Abstract (first publication):**

A találmány nagyszámú rokonvegyület, első sorban kombinatorikai könyvtárakban történő alkalmazásra előállított vegyületek tisztítására és/vagy jellemzésére alkalmas nagy felbontóképességű kromatográfias eljárásra vonatkozik. A vegyületeket félpreparatív vagy preparatív méretekben tisztítják, így minimális kezelői közreműködéssel 90 %-nál nagyobb tisztaságú kombinatorikai könyvtárak állíthatók elő.

**Measures**

**0. Communication of data (A0)**

Measure Announcement: 2000.10.30

**2. Notification of the publication of a patent application (A2) (RU)**

Measure Date: 2001.01.29 Announcement: 2001.03.28

**9. Notification of the performance of novelty search (A3) (RV)**

Measure Date: 2003.01.23 Announcement: 2003.02.28

**11. Lapse of provisional protection (it is considered surrendered) (RW)**

Measure Date: 2003.09.18 Reception: 2003.09.19 Announcement: 2003.10.28

**Nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiai módszer szerves  
vegyületek felbontására**

A találmány vegyületkönyvtárak, ezen belül elsősorban kombinatorikai és első generációs könyvtárak tisztítására és/vagy jellemzésére vonatkozik.

Jelenleg számos eljárás ismert a szintetikus vegyületek tisztítására. Ezek az eljárások általában egyetlen célvegyület többféle szennyeződéstől való tisztítását foglalják magukban.

Az előállított vegyületek viszonylag nagyszámú kombinatorikai és első generációs könyvtárba tartoznak. A vegyületeket gyakran szintetizálják sokmérőhelyes tálcákon vagy sok kémcsövet tartalmazó mintavevőn több ezer rokonvegyülettel együtt. Az ilyen mennyiségben szintetizált vegyületkönyvtárakat nehéz ugyanilyen mennyiségben tisztítani és jellemezni.

A nagyszámú vegyület tisztításának egyik lehetősége az egyes vegyületek ismételt kromatografálásával valósítható meg. Ez minden egyes molekula teljes szintézisciklusát és feldolgozását foglalja magában. Ebben az esetben gyakran nagyon sok időt igényel a tisztítandó vegyületek megfelelő tisztítási eljárásának kidolgozása.

Felmerült az igény olyan, vegyületkönyvtárak tisztítására és/vagy jellemzésére alkalmas hatékony eljárásra, amely szerves vegyületek széles körében alkalmazható. Találmányunk célja ilyen eljárás biztosítása.

Tehát találmányunk célja vegyületek, különösen vegyületkönyvtárak, mégpedig kombinatorikai és első generációs könyvtárak vegyületeinek tisztítására és/vagy jellemzésére alkalmas eljárás biztosítása. Találmányunk kiterjed az eljárásban alkalmazható tisztító berendezésre is.

Találmányunk azon a felismerésen alapul, hogy a szerkezetileg hasonló, például a kombinatorikai és első generációs könyvtárakba tartozó vegyületek vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) lemezen meghatározott retenciós faktora ( $R_f$ ) és nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiás (HPLC) oszlopon meghatározott retenciós ideje többnyire hasonló. Eljárásunkban ezt a felismerést használjuk fel a hasonló vegyületekből álló könyvtár optimális tisztítási körülményeinek meghatározására.

A legtöbb vegyület meghatározott oszloptöltet, oldószerrendszer és áramlási sebesség mellett meghatározott mértékben hajlamos az analitikai és/vagy preparatív HPLC oszlopról eluálódni. Hasonló módon a legtöbb vegyület a TLC lemezen is meghatározott mértékben mozdul el. Amíg bizonyos vegyületek egyáltalán nem mozdulnak el ( $R_f=0$ ), mások kis  $R_f$  értékkel (például  $0,05 < R_f < 0,2$ ), közepes  $R_f$  értékkel (például  $0,2 < R_f < 0,8$ ) vagy nagy  $R_f$  értékkel (például  $R_f > 0,8$ ) mozdulnak el. Könnyen meghatározható az a három vagy több, előnyösen négy vagy több  $R_f$  zónából álló sorozat vagy – analitikai HPLC esetében – retenciós idő-zóna sorozat, amelyben a könyvtár vegyületeinek többsége eluálódik (analitikai HPLC esetén) vagy elmozdul (TLC esetén), például egy TLC lemezen kis, közepes és nagy  $R_f$  értékekkel. Ezek a zónák megfelelnek a preparatív vagy félpreparatív HPLC alkalmazásával végzett preparatív vagy félpreparatív eljárásoknak.

Egy adott analitikai HPLC és/vagy TLC protokoll esetén alkalmazott preparatív HPLC körülmények úgy azonosíthatók, hogy az egyik zóna vegyületei elválaszthatók a többi zóna vegyületeitől. Ennek megfelelően, ha a vegyületkönyvtár reprezentatív mintájában lévő összes vagy lényegében összes vegyület ugyanabban a zónában van jelen, akkor a könyvtár ugyanazon HPLC protokoll alkalmazása-

val tisztítható, és az könnyen megfeleltethető egy TLC és/vagy analitikai HPLC zónának.

A találmányunk szerinti eljárás egy vegyületkönyvtárból, mégpedig kombinatorikai vagy első generációs könyvtárból származó reprezentatív vegyületminta TLC és/vagy analitikai HPLC vizsgálatára vonatkozik, amelynek során meghatározzuk, hogy a minta a TLC lemezen melyik zónában mozdul el, és/vagy az analitikai HPLC oszlopról melyik zónában eluálódik. A zóna azonosítása után a könyvtár tisztítására egy megfelelő preparatív vagy félpreparatív eljárást használunk.

A vegyületkönyvtár tisztítására alkalmas körülményeket a könyvtár egy reprezentatív mintáján határozhatjuk meg egy adott analitikai HPLC oszlopon, oldószerrendszerrel és áramlási sebességgel és/vagy egy adott TLC lemezen és oldószerrendszerrel végzett útirány kutatással. A megfelelő preparatív vagy félpreparatív HPLC eljárás a tisztítási paraméterek megváltoztatása nélkül alkalmazható a vegyületkönyvtár tisztítására, ezáltal egyetlen eljárás alkalmazható a teljes könyvtárra.

A megfelelő mintaméret nagyságrendje a könyvtár 2 % és 5 % közötti hányada a könyvtárban lévő vegyületek különbözőségétől függően. Ezt a megközelítést a továbbiakban „útirány kutatásnak” nevezzük, mivel ezzel derítjük fel a megfelelő tisztítási utat.

A reprezentatív vegyületmintán előnyösen mind TLC mind HPLC vizsgálatot végzünk. Az is előnyös, ha a teljes könyvtár tisztítása előtt a könyvtárból származó vegyületmintán preparatív vagy félpreparatív HPLC vizsgálatot végzünk. Ez lehetőséget nyújt annak bizonyítására, hogy a körülmények megfelelőek a teljes könyvtár tisztítására vagy például a reprezentatív mintában lévő vegyületek tisztaságának meghatározására. A TLC vizsgálatot elvégezhetjük a

könyvtár 10 %-a és 100 %-a közötti, előnyösen 50 %-a és 100 %-a közötti hányadán, és ezt a TLC vizsgálatot összehasonlítjuk a reprezentatív mintáéval. A teljes könyvtáron végzett TLC eljárással és/vagy a reprezentatív vegyületminta tisztaságának, meghatározásával biztosíthatjuk a könyvtár nagy részének megfelelően tisztaságát. Ha a reprezentatív minta tisztasága nem megfelelő, vagy ha a könyvtár TLC vizsgálata nem megfelelően egyezik a reprezentatív mintáéval, más HPLC körülményeket használunk.

A reprezentatív mintának lehetőleg fel kell ölelnie a könyvtárban szintetizált legpolárosabb és legkevésbé poláros vegyületeket, ez segít a teljes könyvtárra alkalmazható eljárás kidolgozásában.

A találmányunk szerinti eljárással jelentős idő takarítható meg a vegyületkönyvtár tisztítása és jellemzése során és a vegyületek 90 %-osnál nagyobb tisztasággal állíthatók elő.

A vegyületeket általában kombinatorikai könyvtárak formájában gyakran sokmérőhelyes tálcákon vagy sok kémcsövet tartalmazó mintavevőn szintetizálják. A vegyületek szintézisében, tisztításában és vizsgálatában a legjelentősebb szűk keresztmetszet a vegyületek tisztítási körülményeinek meghatározása. A találmányunk szerinti eljárásban részletesen ismertetjük, hogyan tisztítható a rokon szerkezetű vegyületek teljes könyvtára.

Az eljárás azon a felismerésen alapul, hogy szerkezetileg hasonló vegyületek, amelyek például kombinatorikai és első generációs könyvtárakba tartoznak, vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) lemezen és nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiás (HPLC) oszlopon mutatott retenciós ideje gyakran nagyjából hasonló. Egy adott szorbens, oldószerrendszer és áramlási sebesség esetén a legtöbb vegyület a lemezen meghatározott mértékben mozdul el. Például bizonyos vegyületek egyáltalán nem mozdulnak el ( $R_f$  értéke közel 0),

mások kis  $R_f$  értékkel (például 0,05 és 0,2 értékhatárok között), közepes  $R_f$  értékkel (például 0,2 és 0,8 értékek között) vagy nagy  $R_f$  értékkel (0,8-nál nagyobb érték) mozdulnak el. Eljárásunk során ezt a felismerést alkalmazzuk a hasonló vegyületeket tartalmazó könyvtárak optimális tisztítási körülményeinek kidolgozására.

Eljárásunk előnye, hogy amennyiben végzünk analitikai HPLC vizsgálatot, azt egy reprezentatív mintán végezzük a preparatív HPLC eljárás végrehajtása előtt. Az itt ismertetett eljárás alkalmazásán alapuló preparatív HPLC eljárással tisztított összes vagy lényegében összes vegyület tisztasága 90 %-osnál nagyobb.

„Preparatív HPLC” és hasonló kifejezéseken olyan HPLC rendszert értünk, amellyel a  $\mu\text{g}$ -ok felsőtartományába eső (500  $\mu\text{g}$  vagy ennél nagyobb) vagy  $\text{mg}$ -os vagy  $\text{g}$ -os méretű termékfrakciók biztosíthatók. „Preparatív” kifejezésen preparatív és félpreparatív oszlopokat értünk, azonban nem értjük bele az olyan analitikai oszlopokat, amelyekkel  $\text{ng}$  és a kisebb  $\mu\text{g}$  tartományba tartozó frakciók állíthatók elő.

A kapcsoló szelepre vonatkozóan „mechanikusan működtethető” kifejezésen olyan szelepet értünk, amelynek különböző helyzeteit nem manuális módon, például számítógéppel működtetjük. Ez a mechanikus működtetés lehet elektromos (azaz szolenoiddal szabályozott szelep), pneumatikus (azaz légnyomással szabályozott szelep), hidraulikus (folyadéknyomással szabályozott szelep) vagy bármilyen más ekvivalens megoldás.

„HPLC kompatibilis detektor” kifejezésen HPLC rendszerben történő használatra alkalmas detektort értünk, amely a vegyületcsúcs elúciójánál detektálható jelet biztosít. Például HPLC kompatibilis detektornak nevezzük az olyan detektort, amely jelet képes generálni, amikor egy vegyület eluálódik az oszlopról. Amikor a kompo-

nens abszorbanciája széles határok között változik, egynél több detektor alkalmazása válhat szükségessé. „Inkompatibilisnak” nevezük a detektort, ha képtelen egy nem kívánt csúcs detektálására.

„Hulladéktartály” kifejezésen a kéréses vegyületet nem tartalmazó eluátumok, például a futtatások közben az oszlop regenerálására használt oldószer vagy a kérdéses vegyület eluálása előtt és után az oszlopról lejövő eluátumok összegyűjtésére szolgáló tartályt értjük. Alkalmas hulladéktartályok lehetnek például lombikok, palacok vagy üvegek.

### **HPLC berendezés**

A helyettesítő kromatográfia (például a HPLC) azon az elven alapul, hogy a minta egyensúlyban van az állófázis (SP) és a mozgófázis (MP) között, az SP irányában eltolódva. Egy minta egyes komponensei úgy helyettesítik egymást, mint a vonatok, ahol az SP iránt nagyobb affinitást mutató helyettesítő anyag ezt a vonatot részletekben kitolja az oszlopról. A helyettesítő kromatográfia legismertebb példái a gázkromatográfia, a folyadékkromatográfia és a HPLC.

Egy HPLC berendezés jellemzően legalább az alábbi komponenseket foglalja magában: egy megfelelő állófázissal töltött oszlop, egy mozgófázis, egy szivattyú, ami a mozgófázist nyomás alatt az oszlopon keresztül nyomja, és egy, az oszlopról eluálódó vegyületek jelenlétének detektálására alkalmas detektor. A berendezés adott esetben gradiens elúció biztosítására alkalmas eszközt is tartalmaz, habár ez nem feltétlenül szükséges a találmányunk szerinti eljárás megvalósításához.

A HPLC elválasztási eljárás kivitelezésére alkalmas szokásos eljárásokat és berendezéseket a szakirodalomban ismertették, például az alábbi irodalmi helyeken: J. Chromatography; 192, 222-227



(1980), J. Liquid Chromatography; 4, 661-680 (1981) és J. Chromatography; 249, 193-198 (1982).

Megfelelő állófázisok azok, amelyekben a kérdéses vegyület eluálódik. Előnyös oszlopok a reverz fázisú oszlopok, amelyek lehetnek természetes (különböző hosszúságú alkyl-láncokat tartalmazó szilikagél) vagy szintetikus (sztirol- és divinilbenzol-tartalmú) térhálósított polimer alapúak. Az állófázis részecskemérete néhány  $\mu\text{m}$  és néhány száz  $\mu\text{m}$  közötti tartományban van. A legelőnyösebb állófázis egy  $\text{C}_{18}$  oszlop.

A megfelelő detektáló berendezés lehet például tömegspektrométer vagy UV detektor. Az itt ismertetett eljárásokban mindkét fenti típusú detektort alkalmazzuk a minta meghatározására.

Az itt ismertetett eljárásban a szivattyúfejtől, az oszlopmérettől, a mozgófázistól és a szorbens részecskeméretétől függően gyakran van szükség viszonylag nagy (például körülbelül 2000 pszi) nyomás alkalmazására. Ez a nyomás meghaladhatja a preparatív HPLC normális működési körülményei között szokásosan alkalmazott értéket. Az eljárásban szintén gyakran van szükség a szokásos preparatív HPLC eljárás normális működési körülményei között végzett használatot meghaladó (például 30 ml/perc értéket meghaladó) mértékű mozgófázis áramlási sebesség alkalmazására.

Egyes megvalósítási módoknál mozgófázisként metanol/víz elegyet használunk. A metanol/víz oldószerrendszerek sűrűbbek, mint az egyéb, acetonitril/víz elegyen alapuló ekvivalens rendszerek (amelyeket gyakrabban használnak, azonban költségesebbek). A megnövekedett viszkozitás nagyobb ellennyomást hoz létre, ez nagyobb nyomástűrőképességű és a normálisnál tágabb belső átmérőjű csővezetet igényel. Továbbá a viszonylag kis (például 5  $\mu\text{m}$  vagy ki-

sebb) részecskeméretű oszloptöltet (szorbens) alkalmazása ellen-nyomást okoz, ami szintén tágabb csővezet alkalmazását igényli.

### Tisztítási eljárás

Az eljárás hasonló szerkezetű vegyületeket tartalmazó könyvtárból származó reprezentatív vegyületminta TLC és/vagy analitikai HPLC eljárással történő feldolgozását foglalja magában, amellyel meghatározzuk, hogy ezek melyik zónában mozdulnak el a TLC lemezen és/vagy eluálódnak az analitikai HPLC oszlopról. A zóna azonosítása után egy megfelelő preparatív vagy félpreparatív eljárást használunk a könyvtár tisztítására.

A TLC lemezen a retenciós faktorok és/vagy az analitikai HPLC felvételen a retenciós idők három vagy több zóna sorozata határozható meg és viszonyítható az egyes zónák preparatív HPLC protokolljához. A zónák például a TLC lemezen kicsi, közepes és nagy  $R_f$  értékűek lehetnek, ahol a kicsi közepes és nagy önkényes kifejezések, amelyek bármilyen megfelelő módon definiálhatók az adott preparatív vagy félpreparatív HPLC protokollnak megfelelően, amellyel az egyik zóna vegyületei elválaszthatók a többi zóna vegyületeitől. Az adott analitikai HPLC és/vagy TLC protokoll alapján azonosíthatók azok a HPLC körülmények, amelyek között az egyik zónába tartozó vegyületek elválaszthatók a többi zónába tartozó vegyületektől.

Ennek megfelelően, ha egy TLC vagy analitikai HPLC vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy egy könyvtár összes vagy lényegében összes vegyülete (azaz több mint 95 %-a) ugyanazon zónában van jelen, akkor ezek mindegyike ugyanazon HPLC protokoll alkalmazásával tisztítható.

Reprezentatív minta kifejezésen jellemzően a könyvtár kevesebb, mint 10 %-át előnyösebben a könyvtár kevesebb, mint 5 %-át

és legelőnyösebben a könyvtár 2 %-a és 5 %-a közötti részét értjük. A mintában lévő vegyületek száma függ a könyvtár diverzitásától (a polaritást, továbbá a HPLC oszlop retenciós idejét vagy a TLC lemez retenciós faktorát tekintve). A reprezentatív vegyületeknek fel kell ölelniük a könyvtárban szintetizált legpolárosabb és legkevésbé poláros vegyületek körét (ha ez lehetséges) a könyvtár vegyületein alkalmazható eljárás kidolgozásának elősegítésére.

Zóna kifejezésen egy retenciós idő tartományt vagy egy retenciós faktor tartományt értünk. Például bizonyos vegyületek egyáltalán nem mozdulnak el ( $R_f$  érték közel 0) mások kis (például 0,05 és 0,2 közötti)  $R_f$  értékkel, közepes (például 0,2 és 0,8 közötti)  $R_f$  értékkel vagy nagy (nagyobb mint 0,8)  $R_f$  értékkel mozdulnak el. Egy TLC eljárásban ezen retenciós faktor tartományok alkalmazásával három zóna, mégpedig kicsi, közepes és nagy zóna azonosítható. A zónák olyan preparatív vagy félpreparatív HPLC körülményeknek felelnek meg, amelyekkel a TLC lemezen az adott zónában  $R_f$  értékkel mozduló vegyületek tisztíthatók. Egy vegyületsorozatot TLC és preparatív HPLC eljárásnak vetünk alá ezen reprezentatív zónák alkalmazásával, az eredmények az 1. példában láthatók. A vegyületek TLC lemezen történő eluálásához előnyösen 80 térfogat% metanolt és 20 térfogat% vizet tartalmazó oldószerrendszert alkalmaznak, ezt az oldószerrendszert használjuk az 1. példában.

A tisztítási protokollban négy vagy több zónát használunk. A szakterületen járatos személy a megfelelő zónasorozatokat figyelembe véve szubjektív módon könnyen meghatározhatja a TLC lemezen az adott oldószerrendszer alkalmazásával kapott retenciós faktor tartományokat vagy az analitikai HPLC oszlopon az adott oszloptöltet és oldószerrendszer alkalmazásával kapott retenciós idő tartományokat, és meghatározhatja az ezen zónáknak megfelelő preparatív

HPLC körülményeket, amellyel az adott zónába tartozó összes vegyület tisztítható.

Az itt ismertetett eljárás alkalmazásával könnyen meghatározhatók a teljes könyvtárra alkalmazható körülmények. Ez lényegesen gyorsabb futtatási időt eredményez a könyvtárak tisztításánál a szokásosan alkalmazott eljárásokkal összehasonlítva, amelyeknél az egész könyvtárra kiterjedő analitikai HPLC eljárást végeznek a könyvtár preparatív HPLC eljárással történő feldolgozására.

A könyvtár reprezentatív mintájának vizsgálata alapján kidolgozhatjuk a vegyületkönyvtár tisztításához szükséges megfelelő körülményeket az adott analitikai HPLC oszlopra, oldószerrendszerre és áramlási sebességre és/vagy az adott TLC rétegre és oldószerrendszerre. A könyvtár vegyületeinek tisztítására egy megfelelő preparatív vagy félpreparatív HPLC eljárást alkalmazhatunk a tisztítási paraméterek megváltoztatása nélkül, ezáltal egyetlen eljárás alkalmazható a teljes könyvtárra.

Előnyösen mind a TLC mind a HPLC eljárást a minta vegyületein végezzük. Az is előnyös, ha a teljes könyvtár tisztítása előtt preparatív vagy félpreparatív HPLC eljárást végzünk egy, a könyvtárból származó vegyületmintán. Ezzel igazolható, például a reprezentatív mintában lévő vegyületek tisztaságának meghatározásával, hogy a körülmények alkalmasak az egész könyvtár tisztítására. A könyvtár 10 % és 100 % közötti, előnyösen 50 % és 100 % közötti hányadán TLC vizsgálatot is végezhetünk, és összehasonlíthatjuk a reprezentatív minta TLC vizsgálatának eredményével. A teljes könyvtár TLC vizsgálatával és/vagy egy reprezentatív vegyületminta tisztaságának meghatározásával igazolható a könyvtár nagy részének megfelelő tisztasága. Ha a reprezentatív mintában a tisztaság nem megfelelő vagy a könyvtár TLC vizsgálatának eredménye nem

illeszkedik megfelelően a reprezentatív mintához, akkor más preparatív HPLC körülményeket választhatunk.

A találmányunk szerinti eljárás alkalmazásával a könyvtár vegyületeinek tisztításában és jellemzésében jelentős idő takarítható meg, és a vegyületek 90 %-osnál nagyobb tisztasággal állíthatók elő.

Találmányunk egyik megvalósítási módja az alábbi lépéseket tartalmazó eljárást foglalja magában:

- a) a tisztítandó vegyületkönyvtár kiválasztása,
- b) a könyvtár reprezentatív mintáján végzett TLC és/vagy analitikai HPLC eljárás, amely minta a könyvtár 10 %-ánál kisebb hányadát foglalja magában,
- c) a megfelelő preparatív HPLC eljárás meghatározása attól függően, hogy a reprezentatív minta az analitikai HPLC oszlopról hogyan eluálódik (retenciós időzónák azonosítása) és/vagy a minta TLC lemezen hogy mozdul el (retenciós faktor zónák azonosítása), és
- d) lényegében a teljes könyvtár tisztítása,

ahol a megfelelő preparatív HPLC eljárást az analitikai HPLC eljárással kapott három vagy több retenciós időzóna közötti korreláció és/vagy TLC eljárással kapott retenciós faktor zónák közötti korreláció alapján dolgozzuk ki, ezáltal, ha lényegében az egész reprezentatív vegyületminta egy adott zónába esik, egy megfelelő preparatív HPLC protokoll használható a zónába eső vegyületek tisztítására.

Az a) lépésben előnyösen mind analitikai HPLC mind TLC eljárást végzünk. A reprezentatív mintát előnyösen preparatív HPLC eljárással tisztítjuk a teljes vagy lényegében teljes könyvtár tisztítása előtt. A reprezentatív minta tisztítása után előnyösen meghatározzuk a minta vegyületeinek tisztaságát. Ezzel gyorsan és hatékonyan ellenőrizhető az eljárás hatékonysága.

A tisztaság meghatározása után adott esetben azonos vagy lényegében azonos körülmények között végrehajtjuk az a) lépés szerinti TLC eljárást a könyvtár 10 % és 100 % közötti, előnyösen 50 % és 100 % közötti hányadán. Ezzel igazoljuk, hogy a reprezentatív mintán alkalmazott tisztítási körülmények a teljes könyvtárra alkalmazhatók.

A reprezentatív minta tisztaságának ellenőrzésével és könyvtár nagyobb részén végrehajtott TLC eljárással igazolhatjuk, hogy az alkalmazott eljárással a vegyületek megfelelően tisztíthatók és a körülmények a teljes könyvtárra alkalmazhatók. Ha nem érjük el a kívánt tisztaságot és/vagy ha a reprezentatív minta és a könyvtár 10 % és 100 % közötti hányadának TLC vizsgálata azt mutatta, hogy a vegyületek nem azonos zónában mozdulnak el, akkor egy másik preparatív HPLC protokollt kell kidolgozni. Bizonyos esetekben a könyvtár egy részére külön protokoll alkalmazható.

A teljes vagy a lényegében teljes könyvtár preparatív HPLC vizsgálata folyamán a frakciószedést előnyösen a preparatív HPLC oszlopról eluálódó mintában lévő kérdéses vegyület UV és/vagy MS spektroszkópiával detektált jelenlétekor kezdjük meg.

Egyik megvalósítási mód szerint a könyvtár vegyületeinek tisztítása során

a) TLC vagy analitikai HPLC eljárással meghatározzuk a könyvtár egy vegyületének vagy reprezentatív vegyületmintájának  $R_f$  értékét vagy retenciós idejét,

b) az  $R_f$  értéket vagy retenciós időt egy olyan paraméter készlettel viszonyítjuk a preparatív HPLC körülményekhez, amely megfelel a TLC vagy analitikai HPLC eljárás körülményeinek és

c) a könyvtár egy vegyületén vagy vegyületein preparatív vagy félpreparatív HPLC eljárást hajtunk végre, ahol

- i) a preparatív vagy félpreparatív HPLC oszlopról lejövő eluens egy részét egy UV detektorba és egy másik részét egy tömegspektrométerbe (MS) továbbítjuk,
- ii) a kérdéses vegyület UV és/vagy MS detektálással jelzett eluálódása előtti eluenst eldobjuk,
- iii) a kérdéses vegyületet tartalmazó mintát tömegspektroszkópiával jellemezzük,
- iv) a kérdéses vegyületet tartalmazó mintákat összegyűjtjük,
- v) az oszlopot egy megfelelő oldószerrel mossuk, ezáltal az oszlopról a szennyeződésekeltávolítjuk,
- vi) az oszlopot újra ekvilibráljuk és
- vii) a fenti lépéseket szükség szerint minden egyes vegyület tisztítására és/vagy jellemzésére megismétljük.

A fenti eljárás az UV abszorbancia és az MS adatok egyidejű meghatározására alkalmas. Az MS eljárással végzett frakciószedésnek számos kockázata van, ami a kívánt vegyület elvesztéséhez vezethet. Ilyen például a molekulatömeg téves meghatározása, adduktum képződés következtében vagy a vegyület elveszhet annak következtében is, hogy nem ionizálódik az alkalmazott körülmények között. Másrésről az MS-sel történő frakciószedés előnye, hogy csak néhány frakciót gyűjt. Az MS-sel történő frakciószedés előnyeit kihasználhatjuk és következményeit kiküszöbölhetjük a mind UV mind MS detektálás alapján történő frakciószedéssel. Azonban ezen megoldással kapcsolatban problémát jelent, hogy nehéz a frakciószedést UV detektálással megindítani és áramlási gradienst alkalmazni. A folyadékáram MS detektor és a frakciószedő közötti megbízható megosztásának biztosítására a betápláló szivattyú (ez egy folyama-

tos hígítást biztosító szivattyú, amely az MS berendezésbe belépő áramot hígítja a folyadékáram második megosztása előtt) és a szonda közötti vezetékben az ellennyomásnak kisebbnek kell lennie, mint az oszlop utáni kimenet és a frakciógyűjtés közötti vezetékben. A kívánt nyomás eléréséhez a standard HPLC berendezés csővezetét nagyobb átmérőjűre cserélhetjük a nagyobb áramlási sebesség biztosítására, és a frakciógyűjtéshez adott esetben UV/DAD (dióda rendszerű detektor) vagy más megfelelő detektort alkalmazhatunk.

Adott esetben az alábbi lépéseket hajtjuk végre. A vegyületekkel kapcsolatos összegyűjtött információt (azaz UV abszorbanciára és MS-re vonatkozó információt) egy megfelelő adatbázisban tároljuk, előnyösen a vegyületekre vonatkozó további információkkal együtt (mint például a szintézis körülmények, biológiai vizsgálatok, kitermelés és hasonlók). A vegyületek jellemezhetők például  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálattal is. A vegyületek gyorsabb tisztítása céljából a HPLC eljárásban két vagy több oszlopot alkalmazhatunk, amelyek egyikén tisztítjuk a vegyületeket, amíg a másikat vagy többit tisztítjuk és regeneráljuk. Ezzel a lépéssel kiiktatjuk a kromatográfiás egyensúlyi időt.

#### **A tisztítható vegyületek típusai**

A találmányunk szerinti eljárással bármilyen HPLC oszlopon eluálható szerves vegyület tisztítható. A tisztítandó vegyületek előnyösen egy vegyületkönyvtár, előnyösebben egy első generációs vagy kombinatorikai vegyületkönyvtár részét képezik. Az eljárás alkalmazásával elérhető tisztaság jellemzően nagyobb, mint 90 % előnyösen nagyobb, mint 95 %.

„Könyvtár” kifejezésen legalább három, előnyösen  $10^2$  és  $10^9$  közötti, előnyösebben  $10^2$  és  $10^4$  közötti számú vegyületet értünk. Ezeket a vegyületeket előnyösen egyetlen oldatban vagy a szinteti-



zálásukra alkalmas reakcióelegyben állítjuk elő vegyületsorozatként, ami ezek egyszerű szintézisét teszik lehetővé. A vegyületkönyvtár minden egyes tagját izolálhatjuk és adott esetben jellemezhetjük.

A vegyületek jellemzően mag szerkezetűek, amelyek legalább egy helyzetben, előnyösen két vagy több helyzetben különböző funkciócsoportokkal módosíthatók a könyvtár, például kombinatorikai vagy első optimalizálási vegyületkönyvtár előállítására céljából.

A jellemző mag szerkezet egyenes, elágazó vagy gyűrűs szerves vegyület, amely legalább három szénatomot és legalább egy, előnyösen legalább két olyan reaktív helyet tartalmaz, amelyek a szerkezet megváltoztatására irányuló reakciónak alávetethetők, általában más molekuláknak a reaktív helyre történő addíciójával.

A rovarirtószerek családjába tartoznak például az 1-aril-pirazolok, pirrolok, pirolidonok és nikotinsav-származékok. Azonban a megfelelő kötődési helyeken ligandum vegyületek, például szteroidok, hormonok, peptidek, fehérjék, oligonukleotidok, oligoribonukleotidok, enzimek és hasonlóak kötődhetnek.

Megfelelő mag szerkezetű vegyületek például a peptidek, fehérjék, oligonukleotidok, oligoribonukleotidok, oligoszacharidok, alkaloidok, kinolinok, izokinolinok, benzimidazolok, benzotiazolok, purinok, pirimidinek, tiazolidinok, imidazopirazinonok, oxazolopiridinek, pirrolok, pirolidinek, imidazolidonok, guinolonok, aminosavak, makrolidok, penemek, szacharidok, xantinok, benzotiadiazin, antraciklinek, dibenzocikloheptadiének, inositolok, porfirinek, korinok és geometrikus szilárdságot biztosító szénvázak vegyületek (például a dodekahedrán). A mag szerkezetű vegyületek származhatnak természetesen előforduló vegyületekből vagy tartalmazhatnak nem természetes módosulatokat (ilyenek például a nem természetes aminosavak és nukleotidok).

Mag szerkezetükben megfelelően módosított vegyületek például a következők:

1) Aminosav-származékok, amelyek lehetnek például természetes és szintetikus aminosav-maradékok beleértve az összes természetesen előforduló aminosavak természetben előforduló oldallánccokkal módosított származékait, változatait és utánzatait; N-helyettesített glicin maradékok; természetes és szintetikus fajták, amelyekről ismert, hogy funkciójukban utánozzák az olyan aminosav-maradékokat, mint a sztatin, besztatin és hasonlókat.

2) Nukleotid származékok, amelyek lehetnek természetes és szintetikus nukleotidok, mint az adenozin, timin, guanidin, uridin, citozin, ezek származékai, továbbá puringyűrűt, cukorgyűrűt, foszfát-kötést utánzó változatai és ezek bármelyikének vagy mindegyikének kombinációja. Nukleotid szondák (2 és 25 közötti nukleotidok) és oligonukleotidok (25-nél nagyobb nukleotidok), beleértve az összes különböző lehetséges szerkezeti módosulatot; a természetesen előforduló nukleotidok homo- és heteroszintetikus kombinációi és permutációi; szintetikus purin vagy pirimidin fajtákat tartalmazó származékok és változatok vagy ezek utánzatai; különböző cukorgyűrű utánzatok és alternatív alapváz analógok számos változata, beleértve a foszfodiészter-, foszfortionát-, foszforditionát-, foszforamidát-, alkil-foszfotriészter-, szulfamát-, 3'-tioformacetát-, metilén(metilimino)-, 3-N-karbamát-, morfolino-karbamát- és peptid-nukleinsav-analógokat, azonban találmányunk nem korlátozódik ezekre.

3) Szénhidrát-származékok, amelyek magukban foglalhatják a természetes fiziológiailag aktív szénhidrátokat és rokon vegyületeiket, mint a glükóz, laktóz, szialsav, beta-D-glükózilamin és nojromicin, amelyek glükozidáz inhibitorok; félcukrok, mint az 5a-karba-2-D-galaktopiranóz, amely ismert módon gátolja a Klebsiella

pneumonia (n=1) növekedését; szintetikus szénhidrát-maradékok és ezek származékai (n=1), továbbá ezek természetben előforduló összes komplex oligomer permutációja, beleértve a nagy molekula-tömegű mannóz-oligoszacharidokat, az ismert sztreptomycin antibiotikumot (n>1).

4) Természetben előforduló vagy szintetikus szerves szerkezeti módosulatok. „Módosulat” kifejezésen olyan szerves molekulát értünk, amely egy biológiai aktivitású speciális szerkezetet tartalmaz, például egy olyan molekula, amely egy enzim aktív helyével komplementer szerkezetű. Ez a kifejezés magában foglalhatja bármelyik jól ismert gyógyszervegyület alapszerkezetét, beleértve a farmakofórokat vagy ezek metabolitjait is. Ezek az alapszerkezetek lehetnek béta-laktámok, mint a penicillin, amely ismert módon gátolja a baktériumok sejtfalának bioszintézisét; dibenzazepinek, amelyekről ismert, hogy a CNS receptorokhoz kötődnek, és antidepresszánsként használhatók; poliketid-makrolidok, amelyek a baktérium riboszómákhoz kötődnek és hasonlóak. Általánosan ismert, hogy ezek a szerkezeti módosulatok a ligandum akceptorokkal szemben speciális kívánatos kötődési tulajdonságokat mutatnak.

5) Reporter elemek, például természetes vagy szintetikus festékek, vagy olyan reaktív csoportot tartalmazó fotográfiás amplifikációra képes csapadékok, amelyek a szulfaminimid szerkezetbe vagy a reakcióvázlatba szintetikus úton bevitethetők, és a csoporton át rögzíthetők anélkül, hogy káros kölcsönhatásba lépnének vagy befolyásolnák a csoport reporter funkcióját. Előnyös reaktív csoportok az amino-, tio-, hidroxil-, karbonsav- és karbonsav-észter-csoport, különösen a metil-észter-, savklorid-, izocianát-, alkil-halogenid-, aril-halogenid- vagy oxiráncsoport.

6) Polimerizálható csoportot, például kettős kötést vagy más, kondenzációra, polimerizációra vagy kopolimerizációra alkalmas funkcióscsoportot tartalmazó szerves csoport, ilyenek például a vinil-, oxirán-, karboxilcsoportok, savkloridok, észterek amidok, azalaktok, laktonok és laktámok. Egyéb szerves csoportok is használhatók, például az R és R' helyettesítő jelentésében megadottak.

7) Nagymolekulájú komponensek, például makromolekuláris felületek vagy szerkezetek, amelyek a szulfaminimid modulokhoz különböző fent említett reaktív csoportokkal oly módon kapcsolhatók, hogy azok nem gyakorolnak káros hatást a ligandum-receptor molekulához kötött kapcsolódó részekre, és a rögzített funkcióscsoport interaktív aktivitását a makromolekula határozza meg és korlátozza. Nagymolekulájú komponensek például a porózus és nem porózus szervetlen komponensek, mint a szilícium-dioxid, alumínium-oxid, cirkónium-oxid, titán-dioxid és hasonló, amelyeket elterjedten alkalmaznak különböző célokra, például normális és reverz fázisú kromatográfiás elválasztásra, víztisztításra, továbbá festékpigmentekben és hasonló esetekben; porózus és nem porózus szerves nagy molekulájú komponensek, például szintetikus komponensek, mint a sztiroldivinil-benzol-ágak, különböző metakrilát-ágak, polivinilalkohol-ágak és hasonló, amelyeket elterjedten alkalmaznak fehérjetisztításra, vízlágyításra és különböző egyéb alkalmazásokra; természetes komponensek, mint a natív és funkcióscsoportot tartalmazó cellulózok, például az agaróz és a kitin, továbbá nylonból, polieterszulfonból és bármilyen más fent említett anyagból készült lapok és üreges szálú membránok. Ezen makromolekulák molekulatömege elérheti a körülbelül 2000 Daltont.

A kémiai módosítás lehet például kémiai kötés, amelyet egy megfelelő szerves csoporttal, radioaktív-csoporttal, hidrogénatommal

vagy olyan szerves csoporttal alkot, amely megfelelő elektrofilcsoportot, például aldehid-, észter-, alkil-halogenid-, keton-, nitril-, epoxid- vagy hasonló csoportot tartalmaz; vagy egy megfelelő nukleofil csoporttal alkot, mint a hidroxil-, amino-, karboxilát-, amid-, karbamion-, karbamid- vagy hasonló, vagy az alábbiakban meghatározott egyéb szerkezeti diverzitást mutató elemek egyikével alkot. Ezenkívül a kémiai módosítás lehet gyűrű, biciklusos vagy triciklusos gyűrűrendszer formájában vagy olyan szerkezet formájában, amely az előző képlet által meghatározott vegyület ismétlődő egységének végéhez vagy egyéb külön csoporthoz kapcsolódik.

A módosítások lehetnek azonosak vagy különbözőek, és ezek mindegyike magában foglalhat egy vagy több szén-, nitrogén-, kén-, oxigénatomot vagy bármilyen más szervetlen elemet vagy ezek kombinációját. Például a mag szerkezet módosítható ciano-, nitro-, hidroxil-, alkoxi-, tio-, egyenes vagy elágazó láncú alkil-, karbociklusos aril- vagy helyettesített vagy heterociklusos csoporttal vagy a módosulat lehet halogén- vagy oxigénatomot tartalmazó származék. A módosulatok szomszédos molekulamagjukban különbözhetnek, és meghatározott sztereokémiai rendszerben lehetnek azon szénatom körül, amelyhez kapcsolódnak.

A vegyületek sokkémcsöves mintavetőben vagy sokmérőhelyes lemezen egy logikai rendszerben lehetnek elrendezve kémiai vegyületek rendszere formájában. A vegyületeknek előnyösen központi mag szerkezetük van, és különböző módosításokat tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik a szerkezet-aktivitás összefüggés azonosítását, ez által lehetővé válik az adott alkalmazásra optimális vegyületek kiválasztása.

Az alrendszert és rendszert olyan minta szerint rendezhetjük el, ami gyorsítja a szintézist, a tisztítást és az értékelést, és a vizsgálá-

latból a legtöbb információtartalom nyerhető ki, továbbá az adatok gyors kiértékelését teszi lehetővé.

Az rendszer a vegyületek logikusan kialakított alrendszereiből épülhet fel. Az alrendszereket úgy alakítjuk ki, hogy azok a közös szerkezetű és a szerkezetükben változtatható módosításokat tartalmazó egyes kémiai vegyületek szerkezetileg rokon, térben irányítható rendszerét tartalmazzák. Az alrendszerek különösen jól alkalmazhatók akkor, amikor a szerkezetet több helyzetben módosítjuk, és egy adott alrendszeren belül bármelyik két vegyület közötti variáció például nulla (0) vagy egy (1) szerkezeti változást okoz.

Ezek az alrendszerek és rendszerek rendszer-készleteket tartalmazó magasabbrendű rendszerekbe szervezhetők, és magasabbrendű rendszerré fejleszthetők, amelyek információt nyújtanak a kérdéses közös mag szerkezet optimális szerkezeti tulajdonságaira vonatkozóan.

Az alrendszerek olyan módon szervezhetők, hogy azok alapján a vegyületek közvetlen összehasonlításával automatikusan információt kaphatunk az ismert fragmensek kívánt alkalmazásra gyakorolt hatására vonatkozóan, továbbá a fizikai és reaktív tulajdonságokban bekövetkező változásokra gyakorolt hatásra vonatkozóan. A bármilyen  $n$  számú függetlenül változtatható szerkezetileg diverz elemből álló egyszerű készlet elmélete szerint  $n$  számú olyan magasabbrendű logikai rendszer létezik, ahol az  $n$  számú szerkezetileg diverz elem mindegyikének megváltozására gyakorolt hatással kapcsolatos információ hasonló módon kapható meg a megfelelően elrendezett alrendszerek relatív irányítottságból származó vizsgálati adatok összehasonlításával.

Az optimális jelöltnek a molekula mag összes lehetséges szintetikus variációjának szkrinelésével történő kiválasztása inkább függ

az adatgyűjtési eljárástól, mint a vegyületválasztásra vonatkozó „racionális” bázistól. A kívánt fizikai és kémiai tulajdonságok, azaz a kötődési affinitás és a bioaktivitás, könnyen optimalizálható, és közvetlenül összefügg az adott rendszeren vagy alrendszeren belüli szerkezeti változásokkal.

Mivel a sokkémcsöves mintavevőben az egyes vegyületek térbeli elhelyezkedése ismert, ezért a rendszer megvizsgálható a rokonszerkezettel kapcsolatos teljes információ meghatározása céljából, ezáltal pozitív eredményt szolgáltat az alábbiakban: (1) egy vegyületre vonatkozó információ bármilyen meghatározott térbeli elhelyezkedésen belül, (2) ezen információ egyidejűleg milyen csatlakozó helyzetben van egy szisztematikusan egynemű szerkezetű vegyületekből álló készlethez képest, (3) rokonszerkezetekre vonatkozó információ kinyerése a negatív eredményekből a pozitív eredmények ismeretében.

A tisztítást előnyösen számítógépes szabályzással végezzük, ahol a sokkémcsöves mintavevőben minden egyes kémcső elhelyezkedését vagy a sokmérőhelyes lemezen az egyes mérőhelyek elhelyezkedését egy számítógépben eltároljuk, továbbá a szintetizálandó vegyület azonosítását is eltároljuk a számítógépben oly módon, hogy egy „memóriatérképen” vagy más módon hozzárendeljük a vegyület adatait a kémcső vagy mérőhely helyzetéhez. Egyik változat szerint a tisztítást manuálisan is végezhetjük előnyösen egy sokkémcsöves mintavevőn vagy sokmérőhelyes lemezen, és az információt egy számítógépen eltároljuk. A kémcsővekben lévő vegyületeket tisztítjuk és/vagy jellemezzük.

Találmányunkat az alábbi példákban mutatjuk be részletesen, azonban találmányunkat nem kívánjuk az ezekben foglaltakra korlátozni.

## 1. Példa: Analitikai eljárások

Egy vegyületsorozatot futtatunk C18 TLC lemezen 80/20 térfogatarányú metanol/víz oldószerrendszer alkalmazásával. Azt találjuk, hogy a vegyületek négy retenciósfaktor ( $R_f$ ) tartomány egyikében helyezkednek el ezek rendre:  $R_f=0$ ,  $0,05 < R_f < 0,2$ ,  $0,2 < R_f < 0,8$  és  $R_f > 0,8$ .

Azokat a vegyületeket, amelyek  $R_f$  értéke 0-tól eltérő egy 50  $\mu\text{m}$ -es 50 mm-es C18 reverz fázisú HPLC oszlopon eluáljuk, amelynek belső átmérője 4,6 mm. A vegyületeket két oldószerből álló rendszer változó gradiensének alkalmazásával eluáljuk, ahol az A oldószer 98/1,5 térfogatarányú víz/acetonitril elegy és a B oldószer 100 %-os metanol.

A 0,2 és 0,8 közötti  $R_f$  értékű vegyületeket az alábbiakban ismertetett I vagy II protokoll alkalmazásával eluáljuk. Azokat a vegyületeket, amelyek  $R_f$  értéke 0,05 és 0,2 közötti, az alábbiakban ismertetésre kerülő II vagy III protokoll alkalmazásával eluáljuk. Azokat a vegyületeket, amelyek  $R_f$  értéke 0,8-nál nagyobb, az alábbiakban ismertetésre kerülő I vagy IV protokoll alkalmazásával eluáljuk. Az említett protokollokat az alábbiakban táblázatos formában mutatjuk be.

1. Táblázat  
I (analitikai) protokoll

Idő (perc)	Aramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	1,5	75	25
5,0	1,5	5	95
6	1,5	0	100
8,0	1,8	75	25



**2. Táblázat**  
**II (analitikai) protokoll**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	1,5	45	55
5,0	1,5	0	100
6	1,5	0	100
8,0	1,8	45	55

**3. Táblázat**  
**III (analitikai) protokoll**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	1,5	30	70
5,0	1,5	0	100
6	1,5	0	100
8,0	1,8	30	70

**4. Táblázat**  
**IV (analitikai) protokoll**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	1,5	95	5
5,0	1,5	5	95
6	1,5	0	100
8,0	1,8	95	5

Ezen négy protokoll esetén analitikai oszlopot és az alábbi négy protokoll esetén (lásd 5-8. táblázat) preparatív HPLC oszlopot használunk (50  $\mu$ m vagy kisebb részecskeméretű C18 szorbenssel töltött 50 mm x 20 mm-es oszlop).

5. Táblázat  
I (preparatív) protokoll

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	28,0	90	10
5,0	28,0	75	25
6,0	30,0	5	95
7,0	25,0	0	100
9,0	25,0	90	10

6. Táblázat  
II (preparatív) protokoll

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	25	70	30
1,0	28	45	55
6,0	28	0	100
7,0	28	0	100
9,0	30,0	70	30

7. Táblázat  
III (preparatív) protokoll

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	15,0	45	55
1,0	28,0	30	70
6,0	28,0	0	100
7,0	28,0	0	100
9,0	30,0	45	55

**8. Táblázat**  
**IV (preparatív) protokoll**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B
0,0	15,0	98	2
1,0	28,0	95	5
6,0	28,0	5	95
7,0	28,0	0	100
9,0	30,0	98	2

Ebben a példában az autoinjektor egy 819 injekciós szelepes indítószerkezettel ellátott Gilson 215 folyadék adagolókar. A frakció-szedő egy Gilson 215 folyadék adagolókar. Gradiensszivattyúként két 50 SC szivattyúfejjel ellátott 306 modell Gilson szivattyút használunk. A hígítószivattyúk 1,5 SC szivattyúfejjel ellátott Gilson 307 szivattyúk. Az ekvibráláshoz használt szivattyú egy 50 SC szivattyúfejjel ellátott programozható 305 modell HPLC Gilson szivattyú. A keverő egy 806 Monometrikus modellel ellátott Gilson 811C dinamikus keverő. A monitor egy Gilson 806 modell nyomásmontor. Az alkalmazott HPLC detektorok egyike egy dióda rendszerű Gilson 170 modell detektor, amely mikrotömegek meghatározására alkalmas Platform LC modell MS detektort tartalmaz. Az MS detektor mind atmoszférikus kémiai ionizálással (APCI), mind Megaflow elektropray ionizációs szondával alkalmazható atmoszférikus nyomásionizáló forrással (API) ellátott kvadropólus tömeganalizátort tartalmaz. A tömegspektrométer egy rotációs szivattyúval és egy transzformátorral van felszerelve. A kapcsolószelepként két Gilson szeleppárt és egy 10 portos Rheodyne kapcsolószelepet használunk. Az elosztó egy 1/1000 ACURATE LC töltet és egy Upchurch elosztó. Az adatgyűjtő rendszer egy Digital CELEB GL-2 számítógépből egy, monitor-

ból és egy Hewlett Packard Laser Jet 6P nyomtatóból áll (Masslynx NT 3,1B6, Windows NT V.4,0 OpenLynx Version™, FractionLynx™ és Gilson's Unipoint v. 1,64 software).

Az automatizált preparatív HPLC/UV/MS berendezés sematikus rajza az 1. ábrán látható.

A rendszer csőméretei a következők:

A keverőből az injektorba, az injektorból az oszlopba, az oszlopból az UV dióda rendszerű detektorba és az UV-ből az elágazásdobozba vezető cső Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0,03" ID. A betápláló szivattyúból az elágazásdobozba vezető cső Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0,01" ID. Az elágazásdobozból az Upchurch elágazóba vezető cső Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0,007" ID. Az Upchurch elágazóból a hulladéktartályba vezető cső Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0,01" ID. Az elágazástól a frakciószedőbe vezető cső 0,04" ID (Tubing Accurate/FC cat. No. PE-1000 FC).

A csőméret 30 ml/perc áramlási sebességet és egy viszonylag kis ( $5\text{ }\mu\text{m}$  vagy ennél kisebb) szorbens részecskeméretet tesz lehetővé az alábbiakban ismertetésre kerülő tisztítási eljárás alkalmazása mellett. A szokásos HPLC eljárásoknál jellemzően alkalmazott kisebb csőmérettel rendkívül nehéz volna ilyen nagy áramlási sebességet elérni, ennek megfelelően a tisztítási eljárás elvégzése nagyon nehézkesé válna.

Az 1. ábrán a minta izolálási útvonala látható a HPLC eljárásban. Injektálás után az A oszlopon a gradiens-szivattyúból érkező oldószerrel elválasztjuk a komponenseket, közben a B oszlopot újraekvilibráljuk egy ekvilibráló szivattyúval. Ezt a műveletet egy 10 portos Rheodyne kapcsolószelep szabályozza. Az elválasztott komponensek egy UV dióda rendszerű detektorba, majd az

elválasztódobozba jutnak. Az elválasztódoboznál a folyadékarám megosztási aránya 1:1000. Csak az egyik rész megy az MS detektorba, a többit a hulladéktartályba vezetjük. A kérdéses vegyület UV vagy MS detektorral történő észlelésekor a frakciószedő működésbe lép és mintát gyűjt. Az MS detektorba jutó áramot egy hígítószivattyú hígítja 1,5 ml/perc áramlási sebességgel az elektropray (ESP) szondához. Ezután a hígított folyadékarámot egy második elágazás megosztja (Upchurch elágazás) és csak körülbelül 300 µl lép be az ESP szondába, a többi a hulladékba kerül. Az atmoszférikus nyomáson működő kémiai ionizáló (APCI) szondához nincs szükség második elágazásra. A gradiens szivattyút Unipoint szoftver alkalmazásával szabályozzuk.

Az MS detektorban a csúcs észlelése és a frakciószedő elérése között késleltetési idő lép fel, és egy további késleltetési idővel kell számolni az UV detektor és az MS detektor között. Ezt kumarin standarddal határozzuk meg 50/50 arányú metanol/viz összetételű mobilfázis alkalmazásával, ahogy az a 9. táblázatban látható.

9. Táblázat

Szonda	Gradiens áramlási se- besség (ml/perc)	Betáplálási áramlási se- besség (ml/perc)	Késleltetési idő (sec) MS-FC	Késleltetési idő (sec) UV-MS
ESP	22	1,5	20	3,5
	28	1,5	15	9
	30	1,5	15	9
APCI	22	0,5	12	23
	28	0,5	15	12
	30	0,5	15	12

A tömegspektrometeren tömegkalibrációt hajtunk végre PEG 200-tól PEG 1000-ig a késleltetési idő meghatározása előtt. A tömeg-

spektrométeret különböző áramlási sebességeknél két szondával beállítjuk.

A HPLC oszlopon különböző vegyületeket juttatunk át az itt ismertetett eljárással. A vegyületek molekulatömege a 100 g/mol és 650 g/mol közötti, a mintaméret 0,1 mg és 200 mg közötti és az injekciós térfogat 50  $\mu$ l és 2000  $\mu$ l közötti.

Az alábbi példában a nagy átmenő teljesítményű tisztítási eljárás alkalmazását mutatjuk be.

## 2. Példa: Kis vegyületkönyvtár tisztítása

Kiválasztjuk a vegyületkönyvtárat és 5 vegyületet vizsgálunk TLC eljárással. Eluensként 80/20 arányú metanol/víz elegyet használunk. A TLC kromatográfia eredménye a 2. ábrán látható.

Kiszámítjuk a TLC eljárás  $R_f$  értékeit, ezek 0,11 körüli értékek és összhangban vannak az előzőleg meghatározott analitikai HPLC eljárással (II és III eljárás az 1. példában). A II és III eljárást külön értékeljük és meghatározzuk, hogy melyik eredményez jobb elválasztást. A kromatogramok azt mutatják, hogy a II eljárás alkalmasabb a vegyület szennyeződéseeinek eltávolítására.

A kérdéses vegyületet preparatív HPLC oszlopon tisztítjuk 2 ml injekciós térfogat és 150 mg vegyület/2 ml dimetilformamid koncentrációban. A vegyületek retenciós ideje preparatív HPLC oszlopon 3 perc és 3,5 perc közötti, ahogy ez a 3. ábrán látható.

A reprezentatív vegyületminta tisztítása után a TLC eljárást a teljes könyvtáron elvégezzük. A TLC eljárás eredménye azt mutatja, hogy az összes kérdéses vegyület körülbelül ugyanolyan  $R_f$  értéknél (körülbelül 0,1) eluálódik, ahogy ez a 4. ábrán látható.

A könyvtár mind a 450 vegyületén preparatív HPLC eljárást hajtunk végre, így 91 % közepes tisztaságot kapunk, a közepes ki-termelés 28 mg. A vegyületek 85 %-ának tisztasága nagyobb 95 %.

A szakterületen járatos személy számára nyilvánvaló vagy rutin- kísérletekkel könnyen kidolgozható a találmányunk szerinti megoldás egyes megvalósítási módjainak számos ekvivalense. Ezek az ekvi- valensek is beletartoznak igénypontjaink oltalmi körébe.

## Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy vagy több szerves vegyület tisztítására és/vagy jellemzésére, azzal jellemezve, hogy

- a) kiválasztjuk a tisztítandó vegyületek könyvtárát,
- b) a könyvtár reprezentatív mintáját vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) és/vagy analitikai nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárásnak vetjük alá, ahol a minta a könyvtár kevesebb, mint 10 %-át tartalmazza,
- c) a reprezentatív minta analitikai HPLC oszlopról történő eluálódásától és/vagy a minta TLC lemezen történő elmozdulásától függően meghatározzuk a megfelelő preparatív HPLC eljárást, és
- d) a teljes vagy lényegében teljes könyvtárt tisztítjuk, ahol a megfelelő preparatív HPLC eljárást analitikai HPLC esetén a retenciós idők három vagy több zónája közötti összefüggés alapján és/vagy TLC esetén a retenciós faktorok három vagy több zónája közötti összefüggés alapján határozzuk meg, oly módon, hogyha a reprezentatív minta lényegében összes vegyülete egy meghatározott zónába esik, akkor egy megfelelő preparatív HPLC protokoll használható a zónába eső vegyületek tisztítására.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépésben mind analitikai HPLC eljárást, mind TLC eljárást végzünk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemez, hogy a reprezentatív mintát preparatív HPLC eljárással tisztítjuk a teljes vagy lényegében teljes könyvtár tisztítása előtt.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reprezentatív minta tisztítása után meghatározzuk a mintában lévő vegyületek tisztaságát.



5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztaság meghatározása után a könyvtár 10 % és 100 % közötti hányadát TLC eljárásnak vetjük alá az a) lépésben alkalmazott TLC eljárással azonos vagy lényegében azonos körülmények között.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reprezentatív minta és a könyvtár 10 %-a és 100 %-a közötti hányadának TLC eredményét összehasonlítjuk.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a könyvtár 50 %-a és 100 %-a közötti hányadát TLC eljárással analizáljuk.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy amennyiben a reprezentatív minta és a könyvtár 10 % és 100 % közötti hányadának TLC vizsgálata azt mutatja, hogy a vegyületek ugyanazon zónában mozdulnak el, akkor a teljes könyvtárat preparatív HPLC eljárással tisztítjuk.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy amennyiben a reprezentatív minta és a könyvtár 10 % és 100 % közötti hányadának TLC vizsgálata azt mutatja, hogy a vegyületek nem azonos zónában mozdulnak el, akkor a teljes könyvtár preparatív HPLC eljárással történő tisztítása során egy másik eljárásváltozatot használunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy reprezentatív mintaként a teljes könyvtár 2 % és 5 % közötti hányadát használjuk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a teljes vagy a lényegében teljes könyvtár preparatív HPLC vizsgálata során a frakciószedést akkor kezdjük meg, amikor a preparatív HPLC oszlopról eluálódó mintában lévő kérdéses vegyület jelenlétét ultra-

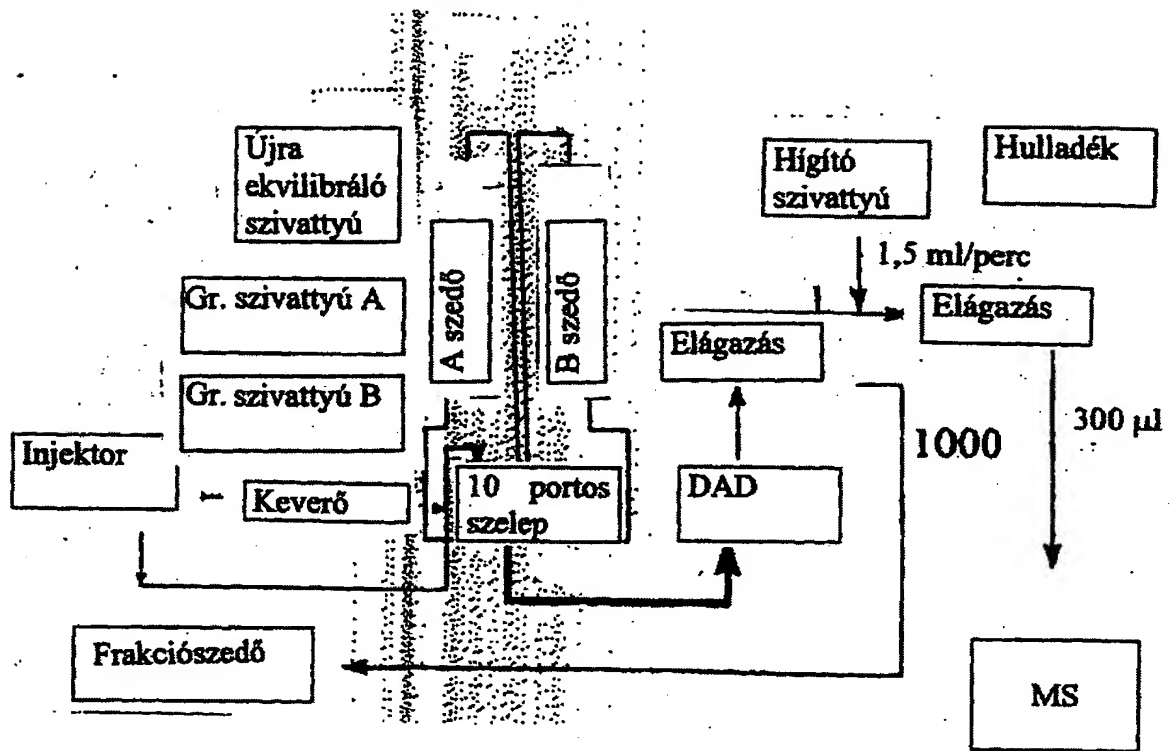
13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy amennyiben analitikai HPLC vizsgálatot végzünk, ezt csak a reprezentatív mintán végezzük a preparatív HPLC eljárás előtt.

9

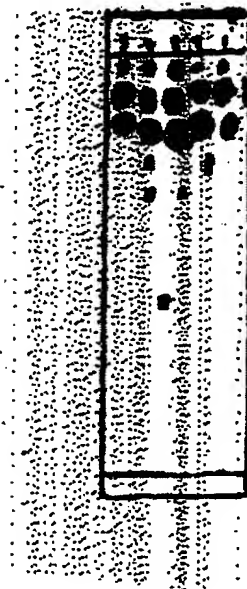
  
DANUBIA  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
47.

Dr. Fehérvári Flóra  
szabadalmi ügyvivő

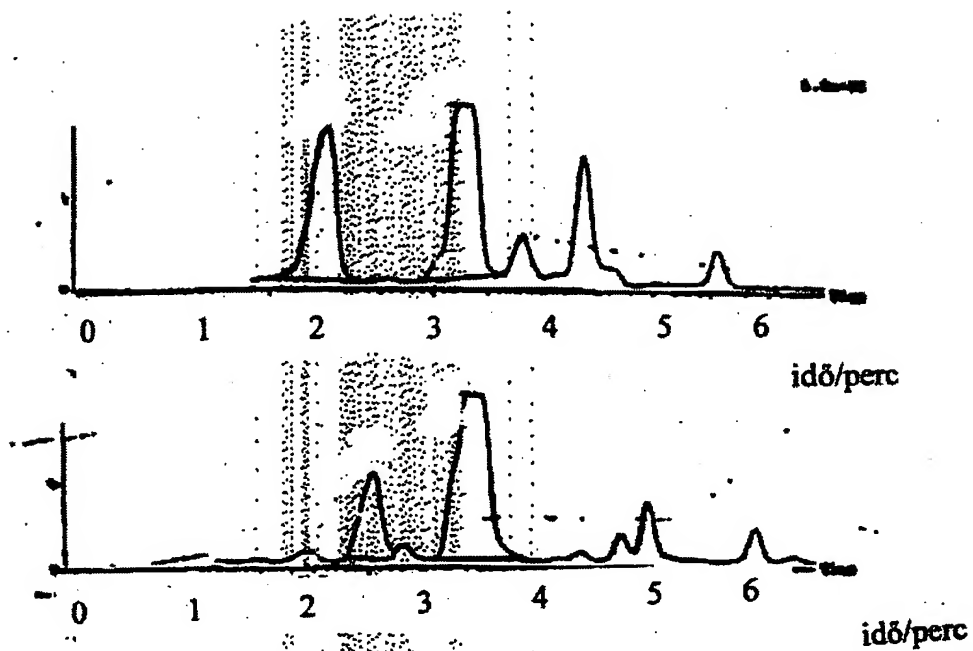
1. ÁBRA



2. ÁBRA



## 3. ÁBRA



## 4. ÁBRA



Nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiai módszer szerves  
vegyületek felbontására

Kivonat

A találmány nagyszámú rokonvegyület, első sorban kombinatorikai könyvtárakban történő alkalmazásra előállított vegyületek tisztítására és/vagy jellemzésére alkalmas nagy felbontóképességű kromatográfiás eljárásra vonatkozik. A vegyületeket félpreparatív vagy preparatív méretekben tisztítják, így minimális kezelői közreműködéssel 90 %-nál nagyobb tisztaságú kombinatorikai könyvtárak állíthatók elő.

*A*  
dr. ...

*2*

*jellemzők*

*32 old + 2 old rajz = 34 old.*

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**